

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020040006955 A  
(43)Date of publication of application: 24.01.2004

(21)Application number: 1020020041572  
(22)Date of filing: 16.07.2002

(71)Applicant: REGENIMED INC.  
(72)Inventor: HWANG, YU SIK  
KOO, HYEON CHEOL  
SEO, HWAL

(51)Int. Cl. A61L 27 /24

(54) COLLAGEN-CATECHIN COMPLEX, PREPARATION METHOD THEREOF AND PROSTHETICS COMPOSITION CONTAINING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: A prosthetics composition containing a collagen-catechin complex is provided, which has high resistance to collagenase and high oxidation resistance and shows no cytotoxicity when it is injected into a soft tissue of a human body. CONSTITUTION: The prosthetics composition contains 50 to 500 parts by weight of a collagen-catechin complex comprising: collagen; and catechin selected from the group consisting of epigallocatechin gallate(EGCG), epigallocatechin (EGC), epichine(EC), epicatechin gallate(ECG), gallocatechin(GC), gallocatechin gallate(GCG), catechin gallate(CG), and green tea polyphenolis(GTP), based on 100 parts by weight of polysaccharide selected from the group consisting of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, and heparin sulfate.

copyright KIPO 2004

Legal Status

Date of request for an examination (20020716)  
Notification date of refusal decision (00000000)  
Final disposal of an application (registration)  
Date of final disposal of an application (20040930)  
Patent registration number (1004654840000)  
Date of registration (20041229)  
Number of opposition against the grant of a patent ( )  
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)  
Number of trial against decision to refuse ( )  
Date of requesting trial against decision to refuse ( )

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.<sup>7</sup>  
A61L 27/24

(11) 공개번호 10-2004-0006955  
(43) 공개일자 2004년01월24일

(21) 출원번호 10-2002-0041572  
(22) 출원일자 2002년07월16일

(71) 출원인 (주)리젠메드  
서울특별시 강남구 대치동 섬유센터빌딩 944-31 섬유센터 4층

(72) 발명자 서활  
서울특별시 성북구 성북2동 295-4  
구현철  
서울특별시 중랑구 면목5동 172-56호  
황유식  
경기도 고양시 일산구 대화동 장성마을 동부아파트 103동 13 02호

(74) 대리인 이영필  
이해영

심사청구 : 있음

(54) 콜라겐-카테킨 복합체, 그 제조 방법, 및 이를 함유하는보형재 조성물

요약

본 발명은 콜라겐분해효소(collagenase)에 의한 콜라겐(collagen) 분해에 대해 뛰어난 저항성을 갖는 동시에 탁월한 항산화 기능을 갖는 콜라겐-카테킨 복합체 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이며, 또한 상기 콜라겐-카테킨 복합체와 다당류(polysaccharide)를 주성분으로 하는 체내 연조직 주입용 보형재(prosthetics) 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 1a

색인어

콜라겐, 카테킨, 콜라겐-카테킨 복합체

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a 및 도 1b는 각각 콜라겐 및 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 형태를 나타낸 도면이다.

도 2a 및 도 2b는 각각 콜라겐 및 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 박테리아 유래 콜라겐분해효소에 대한 활성을 나타낸 도면이다.

도 3a 및 도 3b는 각각 콜라겐 및 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 포유동물 유래 콜라겐분해효소에 대한 활성을 나타낸 도면이다.

도 4a, 4b, 및 4c는 각각 콜라겐 및 EGCG의 단순 혼합물, 숙신화 콜라겐, 및 숙신화 콜라겐과 EGCG의 단순혼합물의 콜라겐분해효소에 대한 활성을 나타낸 도면이다.

도 5a는 콜라겐 및 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 항산화 능력을 나타낸 도면이며, 도 5b는 EGCG의 농도에 따른 항산화 능력을 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 세포 분화 및 성장능에 대한 영향을 나타낸 도면이며, 6a, 6b와 6c는 각각 세포의 배양이 1일째, 3일째, 7일째 되었을 때의 도면이다.

도 7은 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 세포 독성을 분석하기 위하여, 세포만 배양한 것, 세포에 콜라겐을 가하고 배양한 것, 세포에 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체를 가하고 배양한 것을 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하고 찍은 사진이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해에 대해 뛰어난 저항성을 갖는 동시에 탁월한 항산화 기능을 갖는 콜라겐-카테킨 복합체 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이며, 또한 상기 콜라겐-카테킨 복합체와 다당류를 주성분으로 하는 체내 연조직(soft tissue) 주입용 보형재 조성물에 관한 것이다.

인체의 모든 연조직은 콜라겐, 엘라스틴(elastin)과 같은 단백질들과 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)을 포함하는 세포의 기질(extracellular matrix)에 의해 그 해부학적 구조를 유지하고 있다.

종래에는 선천적 또는 후천적 요인에 의하여 연조직의 해부학적 변형이 있는 경우에 합성고분자 물질을 보형재로 사용하여 그 형태를 복원하여 왔다. 이러한, 합성고분자 물질로서 대표적인 것은 실리콘으로서, 분자량 300,000 이상의 고형물을 주로 사용하고, 일부 메틸메타아크릴산(methylmetacrylate) 중합체를 사용하기도 한다.

실리콘 또는 메틸메타아크릴산 중합체 등으로 이루어진 보형재는 생체적 합성이 뛰어나지만, 체내에 영구적인 이물질로 존재하기 때문에 시간 경과에 따라 체내에서 섬유화를 일으키는 경향이 있다('The history of injectable biomaterials and the biology of collagen', *Aesth Plast Surg.* 1985;9:133-140).

한편, 콜라겐 혹은 히알루론산(hyaluronic acid)과 같은 세포외 기질 성분을 단독으로 주입하여 자가 조직과 일체화를 유도하는 방법이 고안되었으나, 체내에 주입된 콜라겐은 콜라겐분해효소에 의해 분해되며, 히알루론산의 경우 역시 주위 조직세포의 세포주기변화에 따라 분해되어, 체내 삽입 후 약 6개월 이내에 소멸되므로 재시술이 필요하다는 단점이 있다.

일반적으로 콜라겐은 세포외 기질로서 세포 침윤을 유인하고 직접 결합하여 구조체의 역할뿐만 아니라 수분과 결합하는 힘이 크기 때문에 조직의 긴장도를 유지하고 유연성을 유지하는 중요한 역할을 하지만, 콜라겐분해효소인 콜라게나아제에 의해 분해가 일어나서 생체내 주입시 콜라겐의 세포에 대한 기질구조체로서의 지속시간이 단축되어 효과적인 조직의 재생을 기대하기가 어렵다는 문제점이 있다 ('The history of injectable biomaterials and the biology of collagen', *Aesth Plast Surg* 1985;9:133-140, 'Quantitative assessment of augmentation therapy', *J Dermatol Surg Oncol.* 1990;16:1147-1151).

상기 문제점을 해결하기 위한 방법으로 콜라겐 분자들을 가교화(crosslinking)시키는 방법이 고안되어 왔으나 ('Injectable agents in the treatment of stress urinary incontinence in women: where are we now?' *Urology* 2000;56:32-40), 주사기를 사용한 주입시 가교화에 의해 콜라겐 분자들이 응집된 상태로 주입되어 고통이 따르며 이로 인한 주입에 어려움이 있어왔다.

이러한 이유로 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해를 억제하기 위한 억제제가 많은 연구진들에 의해 개발되어 오고 있으며, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetate, EDTA), 디티오쓰레이톨(dithiothreitol) 등이 이러한 억제제의 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며, 최근에 들어서는 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate, EGCG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin, EGC) 등의 카테킨류의 물질이 이러한 억제제의 기능 및 항산화 기능을 갖는다는 것이 보고된 바 있으며('Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells', *Biochemica Biophysica Acta*. 2002;1542:209-220, 'Matrix metalloproteinases inhibition by green tea catechin', *Biochemica Biophysica Acta*. 2000;1478:51-60, 'Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds', *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999;63(9):1621-1623, 'Scavenging mechanism of (-)-epigallocatechin 3-gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxyl radicals and formation of superoxide during the inhibitory action', *Free Rad Biol Med*. 1999;27:855-863), 폴리페놀류의 한 종인 플라보노이드(flavonoid)가 구리이온을 촉매제로 하여 콜라겐 또는 엘라스틴(elastin)의 가교화를 일으켜 분해효소에 의한 분해에 대해 억제 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다('Crosslinking of collagen in lathyrism: Influence of a flavonoid' *Ital J Biochem*. 1973;22:148-152, 'Influence of flavonoid-copper complexes on crosslinking in elastin' *Ital J Biochem*. 1977;26:317-322).

그러나, 아직까지 이러한 카테킨들이 어떠한 메카니즘으로 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해를 억제하는지에 대하여는 명확히 밝혀진 바가 없다. 더욱이, 상기 카테킨들은 저농도에서도 심각한 세포독성을 야기함으로써, 그 사용이 극히 제한될 수밖에 없는 문제점이 있다('Protection of extract from leaves of *Ardisia compressa* against Benomyl-induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured rat hepatocytes' *Toxicol in vitro*. 1999;13:889-896, 'Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas', *Biochem Biophys Res Comm* 2001;285:1102-1106).

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해에 대해 뛰어난 저항성을 갖는 동시에, 탁월한 항산화 기능을 가질 뿐 아니라, 세포독성이 없는 보형재 성분을 개발하고자 연구를 거듭한 결과, 콜라겐을 카테킨과 복합체로 형성할 경우, 세포독성이 나타나지 않을 뿐 아니라, 우수한 콜라겐 분해 저항성 및 항산화 기능을 갖는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 콜라겐-카테킨 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명의 목적은 상기 콜라겐-카테킨 복합체의 제조방법을 제공하는 것을 포함한다.

또한, 본 발명의 목적은 상기 콜라겐-카테킨 복합체를 포함하는 보형재 조성 물을 제공하는 것을 포함한다.

#### 발명의 구성 및 작용

상기 기술적 과제를 달성하기 위하여 본 발명에서는,

콜라겐과 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate, EGCG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin, EGC), 에피카테킨(Epicatechin, EC), 에피카테킨 갈레이트(Epicatechin Gallate, ECG), 갈로카테킨(Gallocatechin, GC), 갈로카테킨 갈레이트(Gallocatechin gallate, GCG), 카테킨 갈레이트(Catechingallate, CG), 녹차 폴리페놀(Green Tea Polyphenols, GTP)로 구성된 군으로부터 선택된 카테킨의 콜라겐-카테킨 복합체를 제공하며, 상기 콜라겐은 제1형 콜라겐, 특히 아텔로콜라겐(atelocollagen)이 바람직하고, 상기 콜라겐-카테킨 복합체는 콜라겐 100 중량부에 대하여 카테킨을 0.01 내지 5 중량부 포함하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 콜라겐 및 카테킨을 동시에 용해시킬 수 있는 용매 중에서 콜라겐 및 EGCG, EGC, EC, ECG, EC, GC, GCG, CG, GTP로 구성된 군으로부터 선택된 카테킨을 반응시키는 단계를 포함하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 더마탄 설페이트(dermatan sulfate), 헤파린 설페이트(heparin sulfate)로 이루어진 군으로부터 선택된 다당류 100 중량부에 대하여 제1항에 따른 콜라겐-카테킨 복합체를 50 내지 500 중량부 포함하는 보형재 조성물을 제공한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체에 사용 가능한 콜라겐으로는 제1형 및 제2형 등 다양한 형태의 콜라겐을 모두 사용할 수 있으며, 이 중 생체내 거의 모든 조직의 주 구성성분인 제1형 콜라겐이 더욱 바람직하다. 특히, 아텔로콜라겐은 길이 약 300nm, 직경 약 2.4nm의 크기를 가진 콜라겐 분자의 양측 말단에 존재하는 텔로펩티드(telopeptide)를 제거한 콜라겐으로서, 인체에서 면역반응을 일으키지 않는 장점을 가지므로, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 아텔로콜라겐(atelocollagen)을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체에 사용 가능한 카테킨으로는 EGCG, EGC, EC, ECG, EC, GC, GCG, CG, GTP 등을 사용할 수 있으며, 이 중 가장 높은 콜라겐 분해효소에 대한 억제능을 가진 EGCG 또는 EGC가 더욱 바람직하다.

본 발명에 따른 상기 콜라겐-카테킨 복합체는 콜라겐이 카테킨과의 결합에 의하여 개질화됨으로써 콜라겐 분자가 안정화되어 견고한 구조 기질을 형성하게 되고, 따라서 콜라겐분해효소 활성 억제기능에 의하여 생분해효소에 의한 체내 콜라겐 분해가 지연되게 된다.

또한, 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이 상기 콜라겐분해 억제 효과는 카테킨 단독으로서는 억제제로서의 역할을 하지 못하며, 또한 카테킨의 작용에 의해 일어날 수 있는 콜라겐 분자 사이의 가교화(crosslinking)에 의해 콜라겐분해효과를 나타내는 것이 아닌, 콜라겐과의 구조적 결합 시에 콜라겐분해 억제 효과를 가지게 된다. 따라서, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체에 있어서, 카테킨 자체는 콜라겐분해효소에 대한 억제제로 작용한다기보다는, 콜라겐과 구조적으로 결합함으로써 콜라겐을 안정화하여 콜라겐 분해를 억제하는 것으로 사료된다.

또한, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 콜라겐 100 중량부에 대하여 카테킨을 0.01 내지 5 중량부 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명은 상기 콜라겐-카테킨 복합체의 제조방법, 즉 콜라겐 및 카테킨을 동시에 용해시킬 수 있는 용매 중에서 콜라겐 및 EGCG, EGC, EC, ECG, EC, GC, GCG, CG, GTP로 구성된 군으로부터 선택된 카테킨을 반응시키는 단계를 포함하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조방법을 포함한다.

본 발명의 제조방법에 사용 가능한 용매로는 콜라겐 및 카테킨을 동시에 용해시킬 수 있는 용매이면 어느 것이든 사용할 수 있으며, 예를 들면, 염산, 아세트산, 증류수 등을 사용할 수 있다. 또한, 염에 의해서도 용해되므로, pH 7.5의 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS), 특히 pH 7.5의 트리스-염산 완충용액이 더욱 바람직하다.

본 발명의 제조방법의 반응온도 및 반응시간은 각각 4 내지 25℃의 온도에서, 12 내지 48시간 동안 반응시키는 것이 바람직하다.

본 발명의 제조방법에 따라 제조된 콜라겐-카테킨 복합체는 투석(dialysis), 원심분리(Centrifuge) 등의 방법에 따라 효과적으로 분리할 수 있으며, 이 중 반응하지 않은 카테킨을 효과적으로 제거하여 높은 순도의 분리가 가능한 투석으로 분리하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 반응용액을 예를 들어, 동결건조 등의 건조 방법을 사용하여 건조시켜 최종적으로 분리할 수 있다.

본 발명은 또한 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 헤파린 설페이트로 이루어진 군으로부터 선택된 다당류 100 중량부에 대하여 상기 콜라겐-카테킨 복합체를 50 내지 500 중량부 포함하는 체내 연조직(soft tissue) 주입용 보형재 조성물을 포함한다. 상기 다당류로는 결합조직(connective tissue)뿐만 아니라 눈의 초자체액, 관절의 윤활액, 피부등에서 기질(ground substance)을 이루며 겔(gel)상태로 존재하는 히알루론산이 더욱 바람직하다.

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

#### 실시예 1. 콜라겐-EGCG 복합체(I)의 제조

건조된 아텔로콜라겐을 0.4M 농도의 NaCl을 함유하는 0.01M 농도, pH 7.8의 Tris-HCl 완충용액에 최종농도가 1 w/v%이 되도록 가하고, 4℃에서 24시간 동안, 150±50rpm의 속도로 교반시켜 완전히 용해시켰다. 이렇게 제조된 콜라겐 용액에 EGCG를 최종 농도가 0.1mM이 되도록 가하고, 4℃에서 24시간 동안, 150±50rpm의 속도로 교반하면서 반응시켰다. 반응용액을 4℃에서 72시간 동안 투석(dialysis)시켜 미반응 EGCG를 제거하였다. 얻어진 콜라겐-EGCG 용액을 동결건조시켜 콜라겐-EGCG 복합체를 얻고, 이를 4℃ 이하에서 냉장보관하였다. 콜라겐 및 얻어진 콜라겐-EGCG 복합체의 형태는 각각 도 1a 및 1b와 같으며, 본 발명의 콜라겐-EGCG 복합체는 스폰지(sponge) 형태를 나타내었다.

#### 실시예 2. 콜라겐-EGCG 복합체(II)의 제조

건조된 아텔로콜라겐을 0.4M 농도의 NaCl을 함유하는 pH 7.4의 인산 완충용액(PBS)에 최종농도가 1 w/v%이 되도록 가하고, 4℃에서 24시간 동안, 150±50rpm의 속도로 교반시켜 완전히 용해시켰다. 이렇게 제조된 콜라겐 용액에 EGCG를 최종 농도가 0.1mM이 되도록 가하고, 4℃에서 24시간 동안, 150±50rpm의 속도로 교반하면서 반응시켰다. 반응용액을 4℃에서 72시간 동안 투석(dialysis)시켜 미반응 EGCG를 제거하였다. 얻어진 콜라겐-EGCG 용액을 동결건조시켜 콜라겐-EGCG 복합체를 얻고, 이를 4℃ 이하에서 냉장보관하였다.

### 실시예 3. 콜라겐-EGCG 복합체(III)의 제조

건조된 아텔로콜라겐을 0.001N 농도의 HCl 용액에 최종농도가 1 w/v%이 되도록 가하고, 4℃에서 24시간 동안, 150±50rpm의 속도로 교반시켜 완전히 용해시켰다. 이렇게 제조된 콜라겐 용액에 EGCG를 최종 농도가 0.1mM이 되도록 가하고, 4℃에서 24시간 동안, 150±50rpm의 속도로 교반하면서 반응시켰다. 반응용액을 4℃에서 72시간 동안 투석(dialysis)시켜 미반응 EGCG를 제거하였다. 얻어진 콜라겐-EGCG 용액을 동결건조시켜 콜라겐-EGCG 복합체를 얻고, 이를 4℃ 이하에서 냉장보관하였다.

### 실시예 4. 콜라겐분해효소에 대한 활성 억제능 측정

#### 1. 박테리아 유래 콜라겐분해효소에 대한 활성억제능 측정

콜라겐 및 실시예 1 내지 실시예 3에서 제조한 콜라겐-EGCG 복합체를 사용하여 박테리아 유래의 콜라겐분해효소(*Clostridium histolyticum* 유래의 Clostridiopeptidase A: EC 3.4.24.3)에 대한 활성억제능을 콜라겐 자이모그래피(zymography)법('Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase', Anal Biochem 1998;255:211-216)을 사용하여 시험하였으며, 그 결과는 도 2와 같다. 도 2a 및 2b는 각각 콜라겐 및 실시예 1의 콜라겐-EGCG 복합체에 대한 결과를 나타낸다.

도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 통상의 콜라겐의 경우 콜라겐분해효소에 의하여 콜라겐이 분해되어, 맑은 부분의 영역이 넓게 나타나는데 반하여(도 2a), 본 발명의 콜라겐-EGCG 복합체의 경우 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해가 크게 억제되어 맑은 부분의 영역이 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있다(도 2b).

#### 2 포유동물 유래 콜라겐분해효소에 대한 활성 억제능 측정

포유동물 유래의 콜라겐분해효소(인간 섬유아세포(fibroblast) 유래의 Matrix Metalloproteinase-1; collagenase-1; Interstitial collagenase EC 3.4.24.7)에 대한 활성억제능을 상기 1과 동일한 방법으로 시험하였으며, 그 결과는 도 3과 같다. 도 3a 및 3b는 각각 콜라겐 및 실시예 1의 콜라겐-EGCG 복합체에 대한 결과를 나타낸다.

도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 통상의 콜라겐의 경우 콜라겐분해효소에 의하여 콜라겐이 분해되어, 맑은 부분의 영역이 넓게 나타나는데 반하여(도 3a), 본 발명의 콜라겐-EGCG 복합체의 경우 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해가 크게 억제되어 맑은 부분의 영역이 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있다(도 3b).

#### 3. EGCG의 콜라겐분해 억제능 기전에 대한 시험

콜라겐과 복합체를 형성하지 않는 콜라겐 및 EGCG의 단순 혼합물(A), 콜라겐의 카르복실화 유도체(B), 및 콜라겐의 카르복실화 유도체와 EGCG의 복합체(C)가 콜라겐분해효소에 대한 영향을 확인하기 위해 상기 2에서 사용한 콜라겐분해효소를 사용하여 상기 2와 동일한 방법으로 시험하였다. 상기 콜라겐의 카르복실화 유도체로서 콜라겐을 숙시닐 안하이드라이드(Succinyl anhydride)와 반응시켜 제조한 숙신화 콜라겐(Succinylated Collagen)을 사용하였으며('Succinylated collagen crosslinked by thermal treatment for coating vascular prostheses' Artif Org 1998;22:672-680), 콜라겐 카르복실화 유도체와 EGCG의 복합체는 실시예 1과 동일한 방법으로 제조하였으며, 그 결과는 도 4a, 4b, 및 4c와 같다.

도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 콜라겐 및 EGCG의 단순 혼합물은 콜라겐분해효소에 대한 억제효과를 전혀 나타내지 못하였으며(도 4a), 숙신화 콜라겐(도 4b) 및 숙신화 콜라겐과 EGCG 복합체(도 4c)도 콜라겐분해효소에 대한 억제효과를 전혀 나타내지 못하였다.

상기 결과는 EGCG 자체는 콜라겐분해효소의 억제제로서의 효과가 없으며, 또한 에스테르 결합에 의한 콜라겐 분자 사이의 가교화가 콜라겐분해 억제역할을 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 즉, EGCG가 콜라겐과의 구조적 결합인 복합체(complex) 형태로 존재할 때만 콜라겐분해억제 효과가 나타난다는 것을 확인할 수 있다.

즉, 콜라겐의 NH<sub>2</sub>기가 COOH기로 개질된 것으로 숙신화 콜라겐은 COOH기를 매개로 EGCG의 OH기와 에스테르 결합을 용이하게 형성하며, 숙신화 콜라겐과 EGCG 복합체의 콜라겐 분해 정도가 EGCG로 개질하지 않은 콜라겐과

같은 것으로 보아 콜라겐과 EGCG간의 에스테르결합에 의한 콜라겐 분자의 가교화는 콜라겐 분해 억제능에 크게 관여하지 않는다는 것을 알 수 있다.

또한, 콜라겐을 EO(Ethylene Oxide)로 처리할 때 EO가 콜라겐의 NH<sub>2</sub> 기와 결합하여 콜라겐 분자의 열적 안정도(thermal stability)와 트리플 헬릭스(triple helix)의 안정도가 떨어진다는 점('Influence of ethylene oxide gas treatment on the in vitro degradation behavior of dermal sheep collagen' *J Biomed Mater Res* 1995;29:149-155)을 감안할 때, 숙산화 콜라겐이 EGCG와 복합체(complex)를 이루어 분자적으로 안정화되지 않는 이유는 숙산화시 콜라겐의 NH<sub>2</sub> 기가 모두 COOH기로 전환되면서 콜라겐 분자의 안정도(Stability)가 떨어져 EGCG에 의한 분자적 안정화가 저해된 것으로 생각된다.

따라서, 본 발명에 따른 콜라겐-카테킨 복합체는 카테킨이 콜라겐 분자에 에스테르 결합이 아닌 다른 화학적 결합을 통해 복합체(complex)를 이루어 콜라겐 분자를 안정화시킴으로써, 콜라겐분해효소에 대한 억제능을 나타내는 것으로 사료된다.

#### 실시예 5. 콜라겐-EGCG 복합체의 항산화 능력 측정

본 발명에 의해 개발된 콜라겐-EGCG의 항산화 능력을 다음의 방법을 사용하여 측정하였다('Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', *Free Rad Biol Med*. 1999;26:1231-1237).

7mM ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)용액과 4.9 mM 황산칼륨 용액을 제조하고, 각 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 알루미늄 호일로 차광시킨 후, 교반하면서 12에서 16시간 동안 상온에서 반응시켜 ABTS<sup>+</sup> 용액을 제조하였다. 3%, 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25%, 0.125% 농도의 콜라겐-EGCG 복합체와 콜라겐 용액을 PBS로 제조하고 여러 농도의 EGCG 용액을 제조하였다. 위에서 제조한 시료용액과 ABTS<sup>+</sup> 용액을 1:5의 비율로 혼합하여 30분 동안 반응시키고, 시료용액과 반응시킨 ABTS<sup>+</sup> 용액을 미세-원심분리(micro-centrifuge)로 원심분리하여 상층액만 취했다. 각 시료의 상층액을 734 nm에서 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 리더(reader)로 흡광도(Absorbance)를 측정하였으며, 시료가 들어있지 않은 ABTS<sup>+</sup> 용액의 흡광도를 대조그룹(control)으로 하여 각 시료와 반응시킨 ABTS<sup>+</sup> 용액의 흡광도 감소정도를 측정하였다.

도 5a는 콜라겐 단독 및 본 발명의 콜라겐-EGCG 복합체의 농도에 따른 항산화 능력을 그래프로 나타낸 것이며, 도 5b는 EGCG 단독의 농도에 따른 항산화 능력을 그래프로 나타낸 것이다.

도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 자유 라디칼(free radical)에 대한 탁월한 스캐빈징(scavenging) 효과를 갖는다. 특히, 실시예 1에서 제조한 콜라겐-EGCG 복합체의 항산화능은 도 5b에 나타낸 EGCG 자체만의 항산화능과 비교할 때 약 50  $\mu$ M 농도의 EGCG와 동일한 정도의 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 더욱이, EGCG의 농도가 30  $\mu$ M 이상이 되면 세포독성을 나타내는 점('Protection of extract from leaves of *Ardisia compressa* against Benomyl-induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured rat hepatocytes' *Toxicol in vitro*. 1999;13:889-896, 'Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas', *Biochem Biophys Res Comm* 2001;285:1102-1106)을 감안할 때, 본 발명에 따른 콜라겐-카테킨 복합체는 탁월한 항산화 효과를 가지면서 세포독성이 없는 장점을 가진다.

#### 실시예 6. 콜라겐-EGCG 복합체의 세포영향 분석

본 발명에 의해 개발된 콜라겐-EGCG 복합체의 세포에 대한 영향을 분석하기 위하여 아래의 시험방법을 이용하였다. 사람피부 유래의 섬유아세포를 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM(Dubelco's modified essential medium)배지에서 배양하였다. 콜라겐과 콜라겐-EGCG 복합체를 각각 50  $\mu$ g/ml의 농도로 PBS에 용해시킨 후 조직 배양판(tissue culture plate)에 코팅하였다. 5  $\times$  10<sup>4</sup> 개의 섬유아세포를 콜라겐과 콜라겐-EGCG 복합체가 코팅되어 있는 plate에 배양하였다. 초기 배양 후 1일, 4일, 7일이 지난 후 세포수를 헤마토타이트미터(haematocytometer)를 이용하여 측정하였으며, 7일째 세포의 형태를 검사하기 위하여 메이슨 트리크롬 염색(Masson's trichrome staining) 방법을 이용하여 관찰하였다.

또한 콜라겐-EGCG 복합체의 세포독성의 여부를 확인하기 위하여 아래의 시험방법을 이용하였다. L929 세포를 6 well plate에 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM 배지에 2일 동안 배양하였다. 콜라겐과 콜라겐-EGCG 복합체를 동일한 배지에 각각 3%(w/v)의 농도가 되도록 용해시킨 후, 각 시료가 용해되어있는 배지를 2일 동안 세포가 배양되어 있는 plate에 첨가하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후, 배지를 제거하고 배양되어 있는 세포들을 crystal violet으로 염색하여 세포독성을 관찰하였다.

표 1

	1일	4일	7일
콜라겐	52000 ± 2000	75000 ± 4000	120000 ± 6000
EGCG-콜라겐 복합체	54000 ± 4000	79000 ± 3000	110000 ± 7000

상기 표1의 결과에서 확인할 수 있는 바와 같이, EGCG 자체가 세포의 분화를 억제하는 반면('Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells', *Cancer letter* 2001;170:41-44, 'Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells', *Cancer letter* 2000;158:1-6, 'Green tea polyphenol epigallocatechin inhibits DNA replication and consequently induces leukemia cell apoptosis', *Int J Mol Med* 2001;7:645-652), 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 세포의 분화에 대한 저해 효과가 전혀 없음을 알 수 있다.

또한, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 세포가 섬유아세포의 특징적인 표현형(phenotype)인 스핀들 형(spindle shape)을 나타내므로 세포의 분화에 대한 콜라겐의 기능도 유지하고 있음을 알 수 있었다.

더욱이, 도 7은 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체의 세포 독성을 분석하기 위하여, 세포만 배양한 것, 세포에 콜라겐을 가하고 배양한 것, 세포에 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체를 가하고 배양한 것을 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하고 찍은 사진으로서, 세포만 배양한 것과 세포에 콜라겐을 가하고 배양한 것 뿐만 아니라, 세포에 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체를 가하고 배양한 것 역시 세포 독성 존재시 발생하는 백색 반점이 나타나지 않는 것으로 보아, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 세포 독성을 지니지 않는 것을 알 수 있었다.

#### 실시예 7. 보형재 조성물의 제조

실온에서 인산 완충 생리식염수 용액 100ml에 히알루론산(hyaluronic acid) 0.75g을 넣고, 150±50rpm의 속도로 교반하면서 완전히 용해시켰다. 4℃에서, 실시예 1 내지 실시예 3에서 제조한 콜라겐-EGCG 복합체 3g을 넣고, 150±50rpm의 속도로 교반하면서 완전히 용해시켜 보형재 조성물을 제조하였다. 제조된 상기 용액을 4℃ 이하에서 냉장 보관한다.

#### 발명의 효과

본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 콜라겐분해효소에 의한 콜라겐 분해에 대해 뛰어난 저항성을 갖는 동시에 탁월한 항산화 기능을 가질 뿐 아니라, 세포 독성이 보이지 않는 장점이 있다. 따라서, 본 발명의 콜라겐-카테킨 복합체는 종래의 보형재 조성물에 비하여 뛰어난 효과를 갖는 보형재 조성물로 제조할 수 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

콜라겐과 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate, EGCG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin, EGC), 에피카테킨(Epicatechin, EC), 에피카테킨 갈레이트(Epicatechin Gallate, ECG), 갈로카테킨(Gallocatechin, GC), 갈로카테킨 갈레이트(Gallocatechin gallate, GCG), 카테킨 갈레이트(Catechingallate, CG), 녹차 폴리페놀(Green Tea Polyphenols, GTP)로 구성된 군으로부터 선택된 카테킨의 콜라겐-카테킨 복합체.

##### 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 콜라겐은 제1형 콜라겐인 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체.

##### 청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 콜라겐은 아텔로콜라겐(atelocollagen)인 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체.

##### 청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 콜라겐 100 중량부에 대하여 상기 카테킨 0.01 내지 5 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체.

##### 청구항 5.



콜라겐 및 카테킨을 동시에 용해시킬 수 있는 용매 중에서 콜라겐 및 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate, EGCG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin, EGC), 에피카테킨(Epicatechin, EC), 에피카테킨 갈레이트(Epicatechin Gallate, ECG), 갈로카테킨(Gallocatechin, GC), 갈로카테킨 갈레이트(Gallocatechin gallate, GCG), 카테킨 갈레이트(Catechingallate, CG), 녹차 폴리페놀(Green Tea Polyphenols, GTP)로 구성된 군으로부터 선택된 카테킨을 반응시키는 단계를 포함하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조 방법.

#### 청구항 6.

제4항에 있어서, 상기 콜라겐은 제1형 콜라겐인 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조 방법.

#### 청구항 7.

제4항에 있어서, 상기 콜라겐은 아텔로콜라겐인 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조 방법.

#### 청구항 8.

제4항에 있어서, 상기 콜라겐 100 중량부에 대하여 상기 카테킨 0.01 내지 5 중량부를 반응시키는 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조 방법.

#### 청구항 9.

제4항에 있어서, 상기 용매가 염산, 아세트산, 증류수, pH 7.4 의 인산 (PBS) 완충용액, pH 7.5 의 트리스-염산 완충용액으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 콜라겐-카테킨 복합체의 제조 방법.

#### 청구항 10.

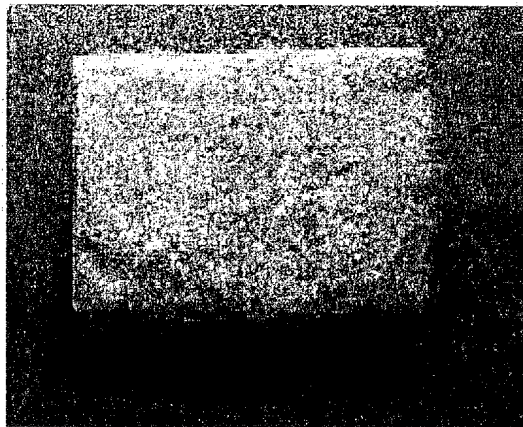
히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 헤파린 설페이트로 이루어진 군으로부터 선택된 다당류 100 중량부에 대하여 제1항에 따른 콜라겐-카테킨 복합체를 50 내지 500 중량부 포함하는 보형재 조성물.

#### 청구항 11.

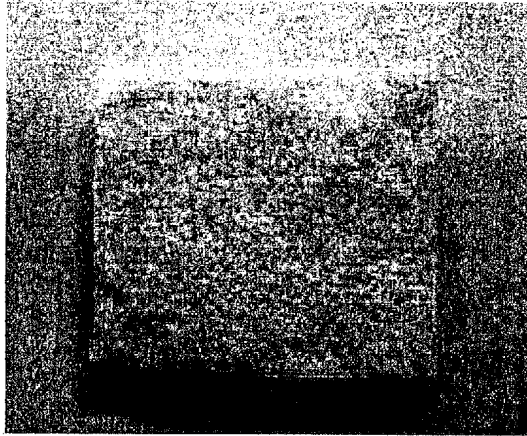
제10항에 있어서, 상기 다당류가 히알루론산인 것을 특징으로 하는 보형재 조성물.

도면

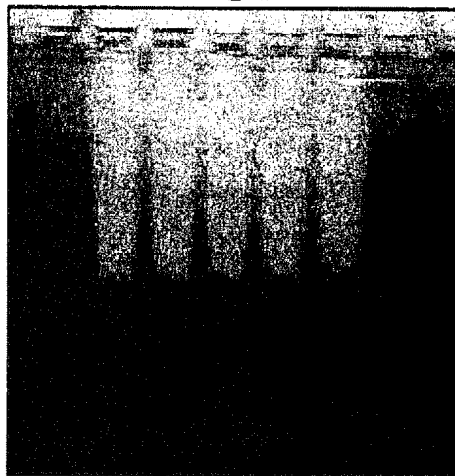
도면 1a



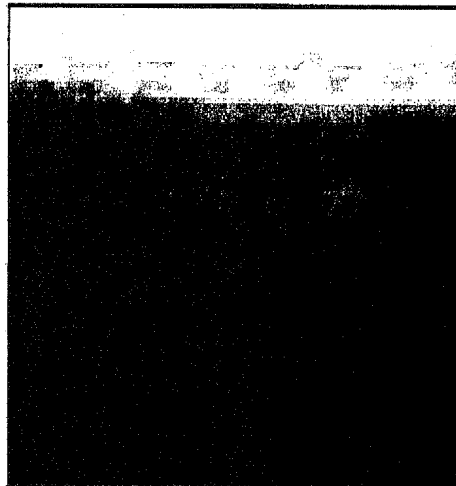
도면1b



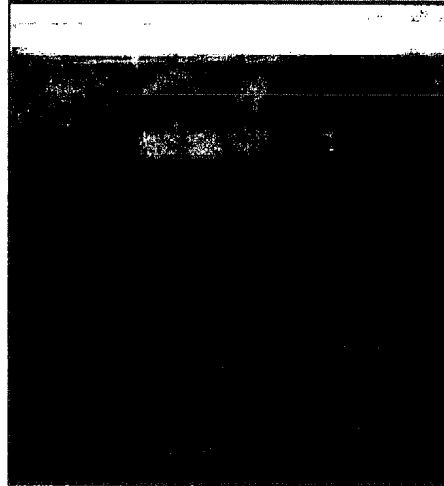
도면2a



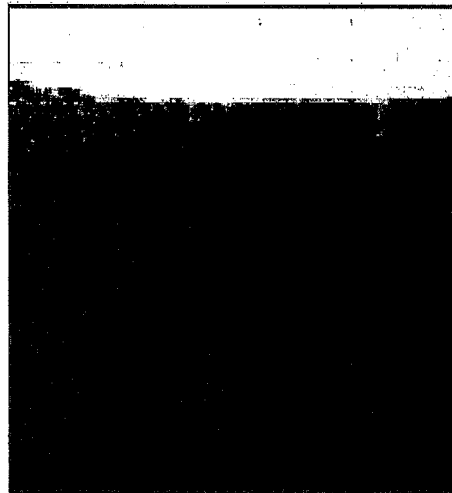
도면2b



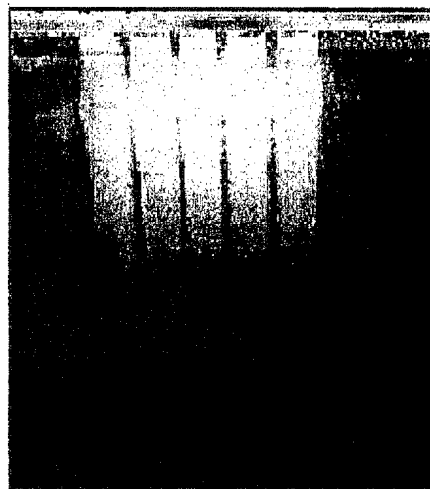
도면3a



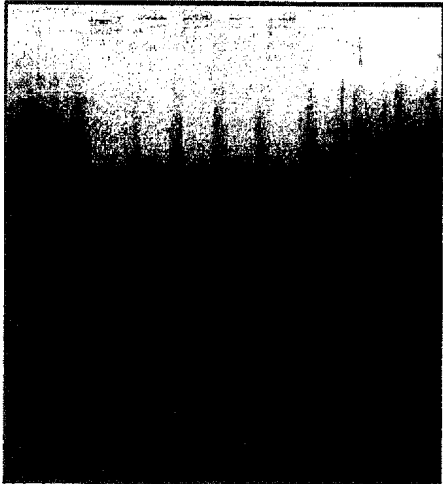
도면3b



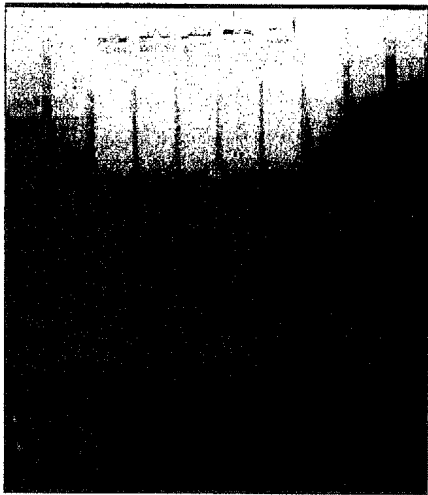
도면4a



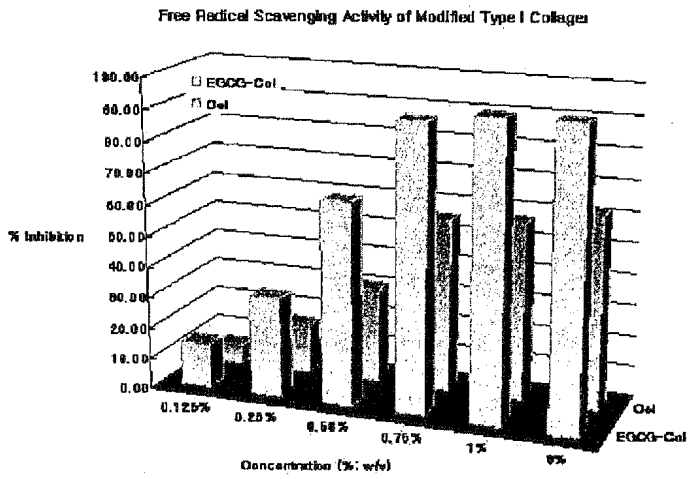
도면4b



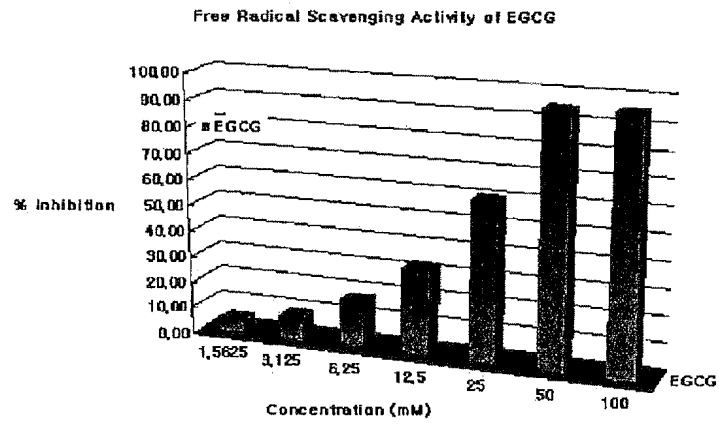
도면4c



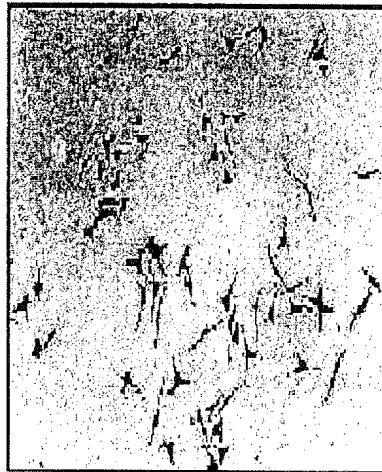
도면5a



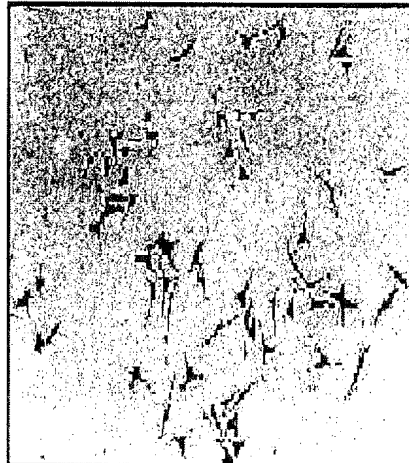
도면5b



도면6a



도면6b



도면6c



도면7

